УДК: 619:616.98

Н.Л. Першикова, , Н.А. Донченко, В.А. Терновой
ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО Россельхозакадемии, Новосибирская обл., п.Краснообск, Институт молекулярной биологии ФГУП ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирская обл., п.Кольцово

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ТИПИРОВАНИЯ MYCOBACTERIUM AVIUM, ВЫДЕЛЕННЫХ В СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ

Введение

Актуальность проблемы типирования возбудителя туберкулёза птиц – Mycobacterium avium – определяется возрастающим числом случаев выделения данного патогена от животных, реагирующих на ППД-туберкулин для млекопитающих и заражением людей с пониженным иммунитетом (ВИЧ-позитивные) [1, 2]. Комплекс Mycobacterium avium включает в себя M. avium и M. inrtacellulare [3, 4]. Возбудитель вызывает туберкулёз у птиц и туберкулёзоподобные поражения у свиней. Имеются сообщения о распространении легочных инфекций у людей, вызываемых M. avium, на территории США [5, 6], Японии [7, 8], Тайланда [9] и Англии [10]. Inderlied C.B. et al (1993) указывают на изоляцию M. avium из почвы и воды [11], а Данко Ю.Ю. (2004) – из проб торфа и молока [12].

Наряду с традиционными методами типирования M. avium (культуральное исследование, биопроба, биохимические тесты) широкое распространение получили молекулярно-генетические методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенировании фрагментов генома микобактерий. Значение молекулярных подходов определяется тем, что они: во-первых, предоставляют наиболее точные из возможных средств слежения за распространением возбудителя; во-вторых, позволяют отслеживать изменения в биологически важных участках генетического материала возбудителя туберкулёза, происходящие в процессе взаимодействия инфекционного агента с организмом чувствительного хозяина и со средой; в-третьих, способствуют описанию структуры популяции возбудителя и позволяют выявлять протекающие во времени изменения в популяционной структуре, которые могут вызвать эпизоотию. Методы диагностики, основанные на достижениях молекулярной биологии и популяционной генетики, позволяют оценивать родственные взаимоотношения между штаммами возбудителя туберкулёза, делать статистически обоснованные выводы и прогнозы о тенденциях распространения туберкулёза.

Цель исследования – установление генотипов выделенных изолятов M. avium и их филогенетическое исследование.

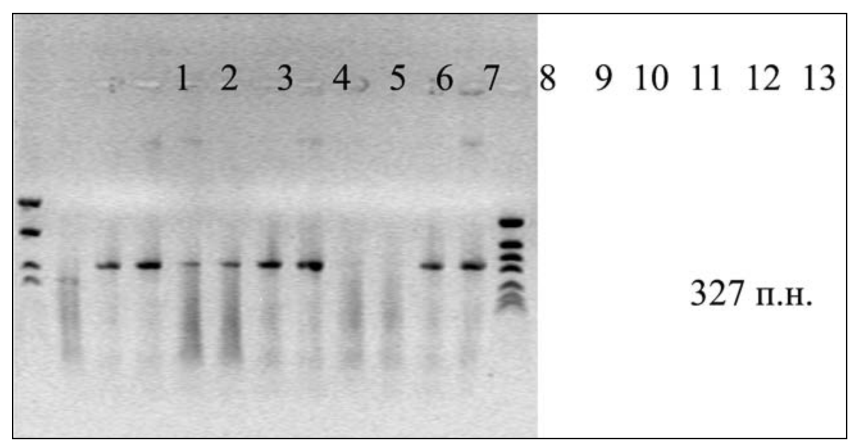


Рисунок 1 - Электрофореграмма фрагмента mig-гена M. avium (№ 1 – маркер pUC19/Kzo9 I, №2 – M. smegmatis, №3 - 10-06, № 4 - 48-01, №5 - 26-06, №6 - 14-05, №7 - 30-04, №8 - 18-06, №9 – M. fortuitum, №10 – M. tuberculosis, № 11 - 8-03, № 12 – 31-03, №13 – маркер pBluescript/Msp).

Материалы и методы.

В работе использованы 24 изолята M. avium, 1 изолят M. tuberculosis, 1 изолят M. smegmatis, выделенных в хозяйствах Новосибирской области в 2001-2006 годах от крупного рогатого скота и свиней, реагирующих на ППД-туберкулин и убитых с диагностической целью, а также референтные штаммы: M. smegmatis ВГНКИ, M. intracellulare, M. fortuitum ВГНКИ, M. tuberculosis шт. Erdman. Для выделения суммарной ДНК из клинических образцов и из культур микобактерий применяли метод сорбции на силикагеле с использованием набора ДНК-сорб В (ЦНИИЭ). Для амплификации использовали следующую пару праймеров: 5´-CCCGTTCAACGTCAACTTCC-3´ и 5´-GGGCTCGCCGGTCATCAGGT -3´, последовательности которой были опубликованы M.L. Beggs et al., 2000 [13]. Постановку ПЦР осуществляли по общепринятым методикам на амплификаторе «Терцик» с использованием следующего режима: 95°C × 5 мин (1 цикл), 95°C × 30 сек, 68°C × 2 мин, 72°C × 5 мин (30 циклов), 72°C × 4 мин.

Анализ полученных в ПЦР данных проводили методом электрофореза в 1,7% агарозном геле, в присутствии бромистого этидия. В качестве маркера использовали pUC19/Kzo9 I и pBluescript/Msp, нанося по 6 мкл в «карман». Результаты электрофореза учитывали в УФ-свете на трансил-

```
Tub31-03  1
{TTCAACGTCAACTTCCGCTACGTCAAAAGCGAACTGCACTACCTGGTCGCGGAC
{TACGAG  60
Tub10-06  1        .......................................................  60
Tub48-01  1        ...........................................C........C....  60
Tub26-06  1        ...........................................C.............  60
CP000479  1562672  ...........................................C........C....  1562613
CP000479  625932   ............A..........G.GG....G....G.......T...ACA...C...C  625990
U43598    790      ...........................................C........C....  849
AE016958  2674569  ...........................................C........C....  2674628
AE016958  575375   ............A..........G.GG....G....G.......T...ACA...C...C  575433
CP000480  2325378  .............A............G.A...............C.GA.C...GC..G.  2325319
CP000480  5975149  ................T......G.GG.G..G..CA.G.....CT...A.A...C...C  5975091
CP000511  2149558  .............A............G.................C.G..C..T.CG.GC  2149499
CP000511  5585687  .......................G..G.T..G...A.G......T...A.A...CG..C  5585629
CP000656  4607755  .............A............G.....G.....G......C.G......GCG.GT  4607814
CP000656  1611061  ...................T...G.GG.T..G...A.G.....            1611103
CP000580  1868037  .............A.........ACGCGA...G....G.......C...AC...AG..G.  1867978
CP000580  5249531  .......................G.GG.G..GT...GG......T...A.A...C...C  5249473
CP000325  4325609  ................G.....G..G.A...G.C...G.....TC.G.....-.G..G.  4325667
CP000325  4545482  .......................G.GG.G..G...A.G......T...ACA...C...C  4545424
{Tub31-03  61      -GCGACCGCGCTGATCTACCA-CGCGGC-GTTCGCGCCCCGGGTG
{GCCGAGATCCTGCCC  117
Tub10-06  61       -...................-......-..............................  117
Tub48-01  61       -...................-....A.-..............................  117
Tub26-06  61       -...................-......-..............................  117
CP000479  1562612  -...................-......-..............................  1562556
CP000479  625991   -AT.GTG......G..C..G.--...C.A..A.T.CGA..........A.CG.G......  626047
U43598    850      -...................-......-..............................  906
AE016958  2674629  -...................-......-..............................  2674685
AE016958  575434   -AT.GTG......G..C..G.--...C.A.CA.T.CGA..........A.CG.G......  575490
CP000480  2325318  -........A...G.G.....-....A.-............CA.C..........GCGA.  2325262
CP000480  5975090  -AT.GT.......                                       5975079
CP000511  2149498  -..C.........C.......-...C..-......C..G..AC.......AG.....G..  2149442
CP000511  5585628  -AT.GT.......G.GC..G.G...C..--.A...CGA..........A.CG.G......  5585572
CP000511  77418                         .-......-.....TT........CA.G.C.......G..  77455
CP000656  4607815  -...........CC.......-.T.A..-......A......C........G....CG..  4607871
CP000580  1867977  -..C.....A...C.......-....TG-C...........C..C......G.G......  1867921
CP000580  5249472  -AT.GTG.........C..G.--...T.A..A.AGC.....C..C...A.CG........  5249416
CP000325  4325668  C..C................-...CA.-.........G.....C.....AG.G..A...  4325725
CP000325  4545423  -AT.GTG...T..G..C..G.--...T.A..A....GA...A..C...A.CG.G.....G  4545367
```

```
{Tub31-03  118      GACCTGCCGGGGCTTCGGGTGCTCCTCCAGATCGCCGACAAGT
{CGGGC  165
Tub10-06  118      .......................A....................... 165
Tub48-01  118      .G.....C............................G........ 165
Tub26-06  118      .G......C.............A....................... 165
CP000479  1562555  .........C.............A.............G........ 1562508
CP000479  626048   ...                                          626050
U43598    907      ..G......C.............A.............G........ 954
AE016958  2674686  ..G......C....A........TA.............G........ 2674733
AE016958  575491   ...                                          575493
CP000480  2325261  ..G..T..CAC...G.........A..............GGT...... 2325214
CP000511  2149441  ........CAAC..CAA...C..GA.............G.C..C... 2149394
CP000511  5585571  ..                                           5585570
CP000511  77456    .......                                      77462
CP000656  4607872  ..T..C..TTC...CAA...C..GA.............G.C..C..  4607918
CP000580  1867920  .........C....G..CACC..GA.....G........         1867882
CP000580  5249415  ...A.......C..                               5249402
CP000325  4325726  ..AT.A..CC....C..C..C..GA.T..A.........G.C..C..  4325772
CP000325  4545366  ...                                          4545364
```

Рисунок 2.Сравнение выравненных последовательностей изолятов M. avium (Tub 31-03, Tub 10-06, Tub 48-01, Tub 26-06)с прототипными штаммами, зарегистрированными ранее в GenBank.

```
1        VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILADLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
2        VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYNAAFAPRVPEILPNLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
3        VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYNAAFAPRVAEILPDLPRLRVLIQIADESGNKLLDGAVDYEDALASV
7        VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPDLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
7TB      VAPFNVNFRYVKSELHYLVADYEATALIYHAAFAPRVAEILPDLPGLRVLLQIADKSGNELLDGAVDYEDALASV
8        VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVTEILPDLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
9TB      VAPFNVNFRYVKSELHYLVADYEATALIYHAAFAPRVAEILPDLPGLRVLIQIADKSGNELLDGAVDYEDALASV
11TB     VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSVATALIYHAAFAPRVAEILPELPRLRVLLQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
13TB     VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHATFAPRVAEILPELPRLRVLIQIADKSGNELLDGAVDYEDALASV
104      VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPDLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
Agy99    VAPFNVNFRYVKNEPQYLLADAGATALIYHATFAPRVAEVLPELPRLRVLIQIADDSGNGLLDGAVDYE------
JLS      VAPFNVNYRYVRDELRYLLDDSGATALLYHACFAPRVAEVLPDLPRLRTLIQVADGSGHELLPGAVDYE------
k10      VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPELPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
KMS      VAPFNVNYRYVRDELRYLLDDSGATALLYHACFAPRVAEVLPDLPRLRTLIQVADGSGNELLPGAVDYE------
MC2 155  VAPFNVNYRYVKNELHYLLTDAGATALVYHATFAPRIAEIRDELPTLRVLIQIADGSGNELLDGAVDYE------
PYR-1    VAPFNVNYRYVKSELHYLLADSGATALLYHAAFAPRLAEVLADLPNLKVLIQIADDSGNELLPGAVDYE------
PYR-GCK  VAPFNVNYRYVKSELQYLLADAGATALLYHSAFAPRLAEVLADLPSLKVLIQIADDSGNELLPGAVDYE------
TUB_001  VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPDLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
TUB_002  VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPDLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
TUB_003  VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPDLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
TUB_004  VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPDLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
TUB_005  VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPDLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
TUB_006  VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPELPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
TUB_007  VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPDLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
TUB_008  VAPFNVNFRYVKSELHYLLKDAGATALVYHAAFAPRVAEILPDLPRLRVLIQIADDSGHDLLYGAVDYETVLASS
TUB_009  VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPELPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
TUB_010  VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPDLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
TUB_011  VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPDLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
TUB_012  VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPDLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
TUB_013  VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPDLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
TUB_014  VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPDLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
TUB_015  VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPDLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
TUB_016  VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPDLPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
U43598   VAPFNVNFRYVKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEILPELPRLRVLIQIADESGNELLDGAVDYEDALASV
```

Рисунок 3 - Сравнительная характеристика аминокислотных последовательностей выделенных изолятов M. avium с прототипными штаммами (str.104, Agy 99, JLS, K10, KMS, MC2155, PYR-1, Pyr-GCK, U43598).

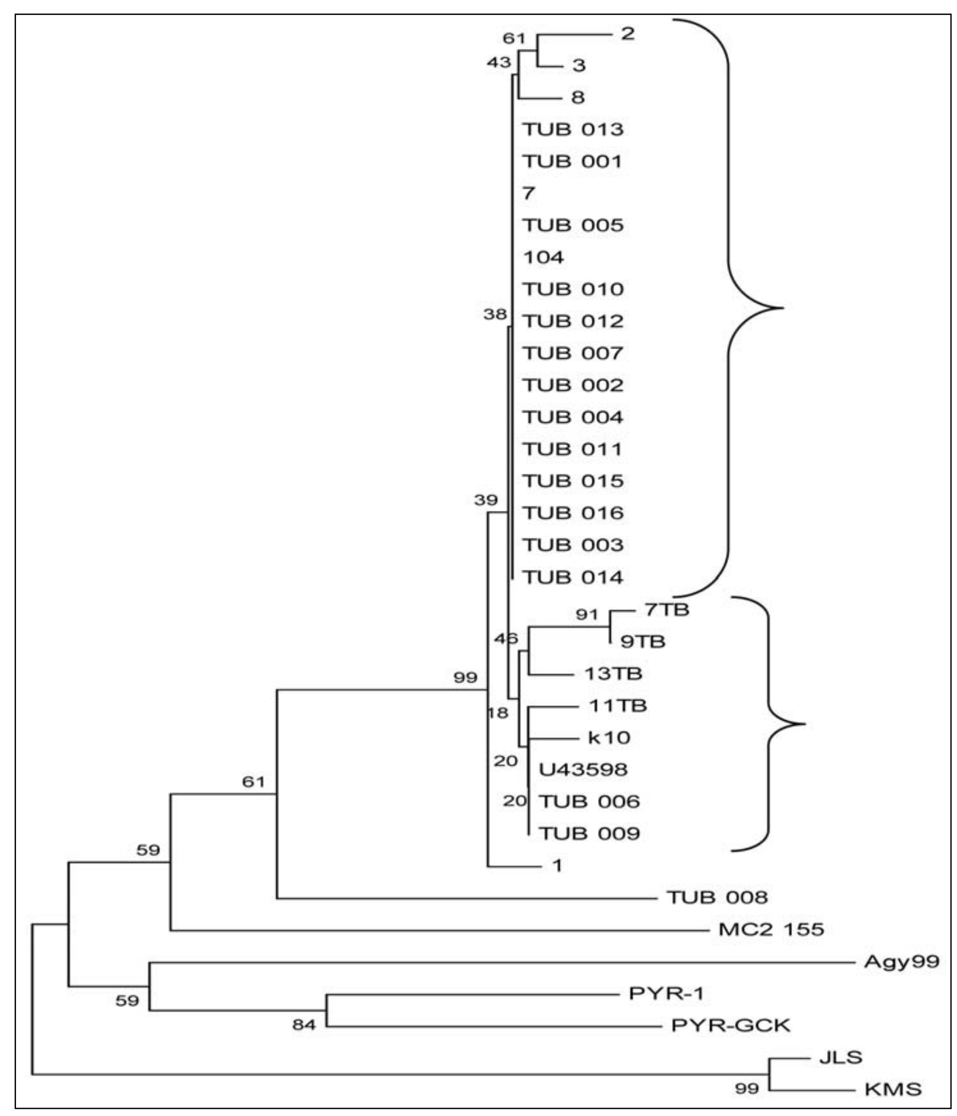


Рисунок 4 - Популяционные взаимоотношения между изолятами M. avium, выделенными в Западной Сибири.

люминаторе с длиной волны 246 нм. Длина полученного в ПЦР, фрагмента составила 327 п.н.

Для определения нуклеотидной последовательности ДНК фрагменты очищали при помощи наборов S.N.A.P.TM Gel Purification Kit для агарозных гелей («InvitrogenlifeTechnologies»).Определение первичной нуклеотидной последовательности проводили на Beckman CEQ2000XL DNA Analysis System («Beckman Coulter, Inc.») согласно инструкции «Beckman sequencing Kit». Популяционный анализ осуществляли с использованием программ MEGA 3.1. (PSU, США) и GeneDoc 2.6. методом «ближайших соседей». Для построения дендрограмм использовали фрагменты нуклеотидных последовательностей микобактерий, депонированных в международной базе данных GenBank (№№ CP000479, U43598, AE016958, CP000480, CP000511, CP000656, CP000580, CP000325). При компьютерной обработке данных нуклеотидные и выведенные аминокислотные последовательности анализировали с использованием программ MEGA. Дендрограммы строили на MegAlign 4.04. из пакета программ DNASTAR. Для статистической обработки данных при оценке достоверности группирования применяли бутстреп-тест.

Результаты исследований.

При ПЦР, специфичный ампликон размером 327 п.н., синтезировался только с ДНК M. avium (рис. 1). При этом реакция

с M. intracellulare, входящего в M. avium complex, была отрицательной, что подтверждает специфичность праймеров, использованных при постановке ПЦР.

Определения нуклеотидных последовательностей изолятов, полученных в сибирском регионе, показали, что фрагмент нуклеотидной последовательности mig-гена M. avium (118 – 165 п.н.) содержит нуклеотидную замену в положении 142 (CAT CCT) (рис. 2.). В сравнении с прототипным штаммом MAU43598 22 клинических изолята M. avium из сибирского региона имеют характерные нуклеотидные и аминокислотные замены в положении 130 п.н. (AGC ACC, S T), 233 п.н. (GCA GGA, A G), 241 п.н. (CCA CCG, P P) и 343 п.н. (CAT CGT, H R).

Выведенные аминокислотные последовательности 3 изолятов M. avium, выделенных в сибирском регионе имеют значительную степень гомологии (89%) с аминокислотной последовательностью изолята M. avium subsp. paratuberculosis K10 (AE016958, 2005 г.) (рис.3). Данный подвид микобактерий комплекса M. avium является этиологическим фактором болезни Крона крупного рогатого скота и имеет >3,000 генов, гомологичных возбудителю туберкулёза человеческого вида [14].

При построении консенсусного ML-дерева для западно-сибирских изолятов M. avium были образованы 2 кластера (рис. 4). Изоляты, входящие в первый кластер генетически близки M. avium штамм 104, а изоляты второго кластера M. avium U43598.

Низкие индексы поддержки вызваны, вероятно, небольшой длиной изученного района и небольшим количеством «горячих точек», содержащих нуклеотидные замены.

Выводы

Несмотря на генетическое родство с западно-европейскими изолятами M. avium изоляты, полученные в западно-сибирском регионе имеют характерные нуклеотидные и аминокислотные замены, которые при проведении популяционного анализа могут служить маркером, позволяющим делать выводы об источнике распространения данного возбудителя. При проведении молекулярно-биологических исследований необходимо учитывать, что популяция M. avium гетерогенна по генотипическим характеристикам, что определяет её адаптацию к меняющимся условиям существования и способствует сохранения вида.

РЕЗЮМЕ

В статье приведены результаты изучения M.avium, полученных в Сибирском регионе, с использованием ПЦР-анализа и секвенирования фрагмента mig-гена.

SUMMARY

In article results of studying M. avium, received in Siberian region, with use PCR-analysis and sequencing a mig-gene fragment are resulted.

Литература

1. Ruf B. Mycobacteremia in AIDS patients / B. Ruf, D. Schurman, W. Brehmer et al. // Klin. Wochenschr. 1989. Vol. 67. P. 717–722
2. Frothingham R. Molecular phylogeny of the Mycobacterium avium complex demonstrates clinically meaningful divisions / R. Frothingham, K.H. Wilson // J Infect Dis. 1994. Vol. 169. №2. P. 305–312.
3. Devallois A. Molecular Characerization on of Mycobacterium avium Complex Isolates Giving Discordant results in AccuProbe Tests by PCR-Restriction Enzyme Analysis 16S rRNA Gene Sequencing, and DT1 – DT6 PCR / A. Devallois, M. Picardeau, C.N. Paramasivan et al. // J. Clin. Microbiol. 1997. Vol. 35, P. 2767–2772.
4. Frothingham R. Sequence-Based Differentiation of Strains in the Mycobacterium avium Complex / R. Frothingham, K.H. Wilson // J. Bacteriol. 1993. Vol. 175. P. 2818–2825.
5. Ahn C.H. Demographic study of disease due to Mycobacterium kansasii or M. intracellulare – avium in Texas / C.H. Ahn, J.R. Lowell, G.D. Onstand et al. // Chest. 1979. Vol. 75. P. 120–125.
6. Kim T.C. Atypical mycobactererial infections: a clinical study of 92 patients / T.C. Kim, N.S. Arora, T.K. Aldrich et al. // South. Med. J. 1981. Vol. 74. P. 1304–1308.
7. Tsukamura M. Epidemiologic studies of lung disease due to mycobacteria other than mycobacterium tuberculosis in Japan / M. Tsukamura, N. Kita, H. Shimoide et al. // Rev. Infect. Dis. 1981. Vol. 3. P. 997–1007. 8. Tsukamura M. Studies of the epidemiology of nontuberculous mycobacteriosis in Japan / M. Tsukamura, N. Kita, H. Shimoide et al. // Am. Rev. Respir. Dis. 1988. Vol. 137. P. 1280–1284.
9. Prammananan T. Distribution of hsp65 PCR-Restriction Enzyme Analysis Patterns among Mycobacterium avium Complex Isolates in Thailand / T. Prammananan, S. Phunpruch, N. Tingtoy et al. // J. Clin. Microbiol. 2006. Vol. 44 P. 3819–3821.
10. Ingram C.W. Disseminated infection with rapidly growing mycobacteria / C.W. Ingram, D.C. Tanner, D.T. Durack et al. // Clin. Infect. Dis. 1993. Vol. 16. P. 463–471.
11. Inderlied C.B. The Mycobacterium avium Complex / C.B. Inderlied, C.A. Kemper, L.E.M. Bermudez // Clin. Microbiol. Rev. 1993. Vol. 6. P. 266–310.
12. Данко Ю.Ю. Эпидимическое и эпизоотическое значение атипичных микобактерий / Ю.Ю. Данко // Актуальные проблемы эпизоотологии на современном этапе: материалы науч.-производ. конф. СПб, 2004. с. 34–35.
13. Beggs M. Specific Identification of Mycobacterium avium Complex Isolates by a Variety of Molecular Technigues / M. Beggs, R. Stevanova, K.D. Eisenach // J. Clin. Microbiol. 2000. V. 38, № 2. P. 508–512.
14. Li L. The complete genome sequence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis /L. Li, J.P. Bannantine, Q. Zhang et al. // Proc Natl Acad Sci USA. 2005. Vol. 30. P. 12344–12349.